

УДК 616:612.017.1

ПОВЫШЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЛАТЕРАЛЬНОГО ПРОТОЧНОГО ИММУНОАНАЛИЗА С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ БИОТИН–СТРЕПТАВИДИН

К.В. Серебrenникова^{1*}, Ж.В. Самсонова¹, А.П. Осипов²

(¹кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; ²НИТУ «МИСис»; e-mail: ksenijasereb@mail.ru)

Предложена новая схема для повышения чувствительности латерального проточного иммуноанализа, основанная на использовании комплексного конъюгата. Комплексный конъюгат представляет собой агломерат наночастиц золота, образующийся путем связывания биотинилированных антител, меченных наночастицами золота, со стрептавидином. Усиление аналитического сигнала происходит за счет скопления агломератов золотых наночастиц в тестовой зоне полоски. Предложенная тест система реализована на примере модельного белка, прокальцитонина, и позволяет проводить анализ в одну стадию без дополнительных реагентов или манипуляций. Диапазон определения прокальцитонина составил от 0,5 до 100 нг/мл с пределом обнаружения 0,25 нг/мл, что в 4 раза превышает чувствительность традиционного латерального проточного иммуноанализа с использованием сферических золотых наночастиц в качестве метки.

Ключевые слова: латеральный проточный иммуноанализ; наночастицы золота; биотин; стрептавидин; прокальцитонин.

В последние годы большой интерес вызывает латеральный проточный иммуноанализ (ЛПИА), которому свойственны простота выполнения, экспрессность и низкая стоимость. ЛПИА-тесты широко используются в клинической диагностике, ветеринарии, пищевой промышленности и охране окружающей среды для качественного и полуколичественного определения антигенов и антител, патогенов, химических соединений и токсинов. Принцип метода состоит в движении под действием капиллярных сил жидкого образца, содержащего определяемое соединение, через различные зоны мембранной полоски с заранее импрегнированными специфическими компонентами. Результат анализа проявляется в виде окрашенных линий в тестовой зоне полоски, причем интенсивность окрашивания пропорциональна содержанию аналита. Наиболее часто в ЛПИА в качестве метки, обеспечивающей формирование детектируемого сигнала, используют коллоидное золото. Несмотря на ряд преимуществ ЛПИА, в случаях, когда необходимо определять очень низкие концентрации аналита, чувствительность данного метода недостаточна. В связи с этим большое внимание уделяется развитию новых подходов для усиления регистрируемого сигнала, в том числе с использованием новых меток

и высокочувствительных систем регистрации. К таким подходам, позволяющим повысить чувствительность ЛПИА с помощью коллоидных золотых наночастиц (20 нм), можно отнести метод усиления серебром [1], а также способ с применением золотых наночастиц в комбинации с ферментом (например, пероксидазой хрена), что приводит к каталитическому усилению сигнала [2]. Для улучшения чувствительности определения используют новые типы реагентов, такие как микросферы нанозолота или иммунные наночастицы, которые позволяют снизить предел обнаружения в 3 раза [3]. Другой способ повышения чувствительности анализа заключается в использовании для количественной оценки результатов различных систем (термоконтраст, лазер или светодиод), что может вызвать усиление сигнала в 1000 раз [4].

В литературе описаны также методы для одновременного определения нескольких маркеров, включающие комбинацию коллоидных золотых частиц и олигонуклеотидов для выявления антигенов и антител [5], а также применение двух мембран с нанесенными на них растворами конъюгатов для одновременного определения двух белков [6]. К недостаткам данных подходов относится наличие дополнительной стадии анализа, что увеличивает время тестиро-

вания, а в некоторых случаях требует использования специальных дорогостоящих приборов для регистрации конечных результатов.

В настоящей работе рассмотрен новый подход с использованием комплексного конъюгата наночастиц золота, позволяющий усилить аналитический сигнал в ЛПИИ. Комплексный конъюгат формируется за счет образования связей между биотинилированными антителами, мечеными наночастицами золота, и стрептавидином. В качестве модельного определяемого антигена при разработке ЛПИИ на основе системы биотин–стрептавидин был выбран белок прокальцитонин (ПКТ), представляющий собой маркер бактериальных инфекций и сепсиса, выявление которого на ранних стадиях заболевания позволяет назначить своевременное лечение и следить за динамикой проводимой терапии. Были подобраны оптимальные условия для получения стабильного комплексного конъюгата на основе меченых биотинилированных антител со стрептавидином и проведен ЛПИИ в модельных растворах, содержащих определенные концентрации ПКТ.

Экспериментальная часть

В работе использовали химические реактивы фирмы «Sigma» (США), неорганические соли фирмы «Helicon» (Россия), рекомбинантный ПКТ человека, моноклональные антитела и поликлональные антитела фирмы «Биалекса» (Россия), стрептавидин («Имтек», Россия) и мембраны фирмы MDI (Индия). В работе использовали 10 мМ фосфатный солевой буфер с рН 7,2–7,4 (ФБС) и ФБС, содержащий 0,1% Твин-20 (ФБСТ). Стандартные растворы ПКТ готовили в ФБСТ из исходного раствора ПКТ с концентрацией 1 мг/мл.

Синтез исходных наночастиц коллоидного золота размером 30 нм проводили по методу Френса [7]. Полученные наночастицы золота были охарактеризованы спектрально в диапазоне 400–900 нм на спектрофотометре «Thermo Scientific Multiscan GO» (США) и методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на приборе «JEOL JEM-2100» (Япония).

Биотинилированные поликлональные антитела получали согласно ранее описанной методике [8]. Молярное соотношение антител к биотину во время синтеза составило 1:8.

Для получения конъюгата биотинилированных поликлональных антител с наночастицами золота в 10 мл раствора коллоидного золота

устанавливали кислотность рН 7,0–7,5, затем добавляли 1 мл биотинилированных антител с концентрацией 15 мкг/мл. Далее смесь перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре, добавляли БСА, сахарозу и азид натрия до установления их конечной концентрации 0,1; 10 и 0,01% соответственно. Для удаления несвязавшихся белков конъюгат центрифугировали (11000 g) в течение 20 мин при 4 °С. Супернатант удаляли, а осадок перерастворяли в определенном объеме ФБС, содержащем 0,1% БСА, 10% сахарозы и 0,01% азид натрия.

Для получения комплексного конъюгата с образованием агрегатов наночастиц золота к полученному раствору конъюгата биотинилированных поликлональных антител с наночастицами золота добавляли раствор стрептавидина в соотношении 15:1, 15:3, 15:5 и 15:10. После пятнадцатиминутной инкубации при комнатной температуре на стекловолоконную мембрану размером 4×4 мм наносили 7 мкл раствора в концентрации, соответствующей оптической плотности $A_{520} = 2$ опт. ед., после чего мембрану высушивали при комнатной температуре.

Для формирования тестовой зоны на аналитическую нитроцеллюлозную мембрану с помощью автоматического диспенсера «BioJet Quanti 3000», «BioDot XYZ 3050» («BioDot», США) наносили раствор специфических антител в концентрации 0,5 мг/мл. Для формирования контрольной зоны на расстоянии 5 мм от тестовой зоны наносили белок А в концентрации 0,25 мг/мл. Полоски высушивали в течение 24 ч при комнатной температуре и хранили при той же температуре в герметичной упаковке.

Растворы комплексных конъюгатов антител с наночастицами золота наносили на мембраны для конъюгата и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Собирали тест-полоски согласно схеме, представленной на рис. 1. На пластиковую подложку (4×80 мм) последовательно наклеивали мембранные носители для образца, конъюгата, аналитической мембраны и впитывающей мембраны.

Для проведения ЛПИИ готовые тест-полоски помещали на горизонтальную поверхность и наносили 100 мкл стандартных растворов с определенными концентрациями ПКТ в ФБСТ. Через 15 мин проводили визуальную и количественную оценку результатов путем сканирования образцов и определения интенсивности окрашивания линий с использованием программы Scion Image.

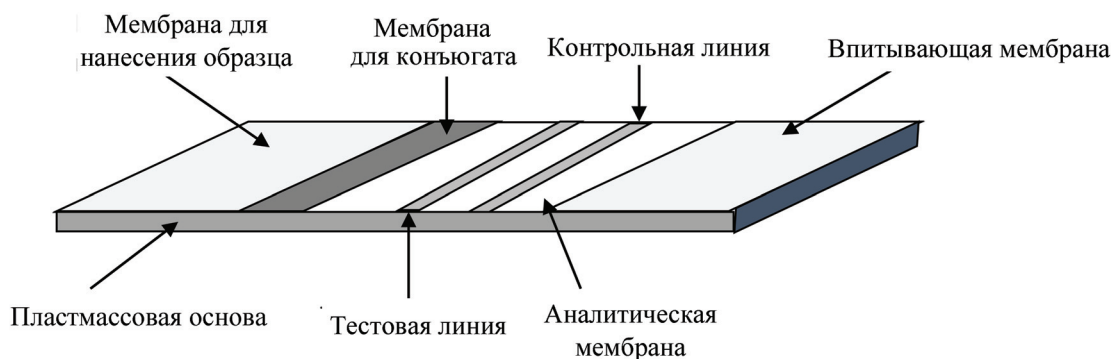


Рис. 1. Схема тест-полоски для проведения ЛПИИ ПКт

Результаты и обсуждение

В качестве модельного белка в ЛПИИ был выбран ПКт – маркер бактериальных инфекций и сепсиса. При системном воспалении бактериальной этиологии в течение 6–12 ч концентрация ПКт в сыворотке крови резко возрастает. Присутствие ПКт в концентрации от 0,05 до 0,5 нг/мл свидетельствуют о наличии локальной бактериальной инфекции. На системную инфекцию без подтверждения диагноза «сепсис» указывает присутствие ПКт в концентрации от 0,5 до 2 нг/мл. Для уточнения диагноза в этих случаях рекомендуется повторить определение содержания ПКт через 6–24 ч. Концентрация ПКт выше 2 нг/мл свидетельствует о высокой вероятности инфекционного процесса с системным воспалением, приводящим к сепсису. Уровень ПКт выше 10 нг/мл (максимально до 1000 нг/мл) определяется у пациентов с тяжелым сепсисом или септическим шоком. Проведение ежедневного контроля уровня концентрации ПКт дает информацию о течении заболевания и позволяет прогнозировать исход сепсиса. Повышенное содержание ПКт в течение продолжительного времени свидетельствует о неблагоприятном течении заболевания. Из вышесказанного следует, что создание экспресс-методов для контроля за уровнем ПКт представляет собой чрезвычайно важную задачу.

В работе в качестве метки специфических антител для проведения ЛПИИ были получены коллоидные наночастицы золота. Данные спектров поглощения (пик в области 530 нм) и результатов ПЭМ свидетельствуют о сферической форме наночастиц золота со средним диаметром $30 \pm 1,5$ нм. Для получения стабильных конъюгатов биотинилированных антител с золотом установлены путем титрования оптимальные

условия: концентрация биотинилированных антител 15 мкг/мл, pH 7,0–7,5.

Для реализации метода ЛПИИ на основе системы биотин–стрептавидин в аналитической зоне мембраны сорбционно иммобилизовали специфические моноклональные антитела. При нанесении образца на тест-полоску раствор по ней продвигался и взаимодействовал с конъюгатом меченых антител. В тестовой зоне происходило связывание иммунокомплекса иммобилизованными специфическими антителами с образованием сэндвич-комплекса. Усилению аналитического сигнала в тестовой зоне способствовало применение комплексного конъюгата, состоящего из биотинилированных поликлональных антител, меченных золотыми наночастицами, и стрептавидина. Каждая молекула стрептавидина содержит четыре сайта связывания биотина и обладает высокой аффинностью по отношению к биотинилированным антителам, сорбированным на поверхности наночастиц золота. При добавлении стрептавидина к конъюгату наночастиц золота с биотинилированными антителами образуются агрегаты наночастиц золота, состоящие из нескольких исходных наночастиц золота меньшего размера. Молекулы стрептавидина в данном случае играют роль эффективной сшивки отдельных исходных наночастиц золота между собой. В результате образуются агрегаты наночастиц, содержащие адсорбированные специфические антитела, при этом реализация специфических иммунохимических взаимодействий на тестовой линии аналитической мембраны в ЛПИИ должна приводить к усилению регистрируемого сигнала за счет увеличения числа связанных наночастиц золота. Такая система должна способствовать повышению конечного регистрируемого сигнала.

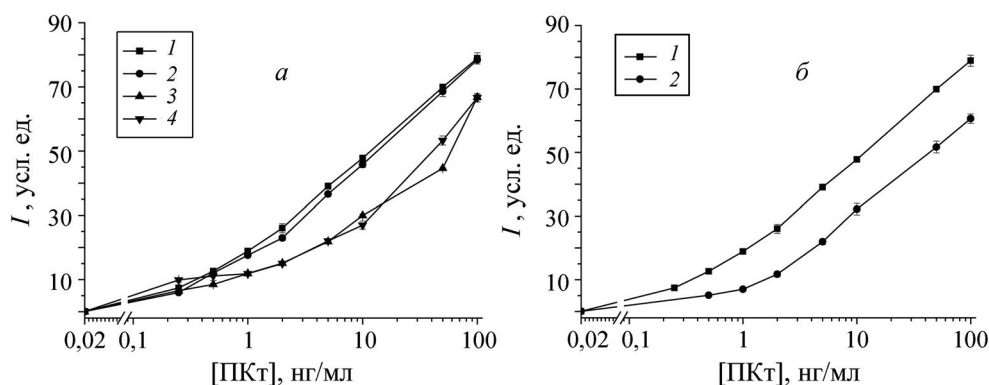


Рис. 2. Градуировочные графики ЛПИИ для определения ПКт с использованием разных иммуно-реагентов: *а* – калибровочные графики ЛПИИ на основе комплексного конъюгата с разным соотношением биотина и стрептавидина (15:1 (1); 15:3 (2); 15:5 (3) и 15:10 (4)); *б* – калибровочный график ЛПИИ на основе комплексного конъюгата, в котором соотношение биотина и стрептавидина составляет 15:1 (1) и калибровочный график традиционного ЛПИИ с использованием в качестве метки золотых наночастиц (30 нм) (2)

ла и уменьшению фоновой активности. В работе было изучено влияние различных концентрационных соотношений биотинилированных пАт, меченных золотыми наночастицами, к стрептавидину на чувствительность ЛПИИ для определения ПКт. Увеличение концентрации стрептавидина в комплексе показало незначительное снижение чувствительности ЛПИИ при определении ПКт, о чем свидетельствуют представленные на рис. 2 калибровочные кривые. Вероятно, это связано с возникающими стерическими затруднениями при связывании антител, иммобилизованных на аналитической мембране, с антигеном в комплексе со сложносоставным конъюгатом. Оптимальное соотношение биотинилированных антител, меченных золотыми наночастицами, к стрептавидину для формирования агрегатов составило 15:1. Линейный диапазон определя-

емых значений концентрации для разработанной тест-системы составил 0,5–100 нг/мл с пределом обнаружения 0,25 нг/мл, время анализа не превышало 10 мин.

Таким образом, наши исследования показали возможность снижения в 4 раза предела обнаружения модельного белка ПКт (маркера бактериальной инфекции и сепсиса) путем использования комплексного конъюгата биотинилированных антител, меченных золотыми наночастицами, со стрептавидином. Данный подход позволяет повысить чувствительность обычных систем ЛПИИ на основе стандартных конъюгатов наночастиц золота и может быть использован для создания быстрых тест-систем, например, для ранней диагностики заболевания и мониторинга эффективности проводимого лечения без использования приборной оценки результатов анализа.

Работа выполнена в соответствии с госзаданием Минобрнауки «Организация проведения научных исследований», соглашение №16.6548.2017/ВУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yang W., Li X. B., Liu G. W., Zhang B. B., Zhang Y., Kong T., Tang J. J., Li D. N., Wang Z. // *Biosens. Bioelectron.* 2011. Vol. 26. P. 3710.
2. Parolo C., de la Escosura-Muñiz A., Merkoçi A. // *Biosens. Bioelectron.* 2013. Vol. 40. P. 412.
3. Tang D., Saucedo J. C., Lin Z., Ott S., Basova E., Goryacheva I. et al. // *Biosens. Bioelectron.* 2009. Vol. 25. P. 514.
4. Qin Z., Chan W. C., Boulware D. R., Akkin T., Butler E. K., Bischof J. C. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012. Vol. 51. P. 4358.
5. Oku Y., Kamiya K., Kamiya H., Shibahara Y., Ii T., Uesaka Y. // *J. Immunol. Methods.* 2001. Vol. 258. P. 73.
6. Zhu J., Zou N., Mao H., Wang P., Zhu D., Ji H. et al. // *Biosens. Bioelectron.* 2013. Vol. 42. P. 522.
7. Frens G. // *Nature Phys. Sci.* 1973. Vol. 241. P. 20.
8. Hermanson G. T. // *Bioconjugate techniques.* Oxford, 2008. P. 382.

IMPROVED SENSITIVITY OF LATERAL FLOW IMMUNOASSAY USING THE BIOTIN-STREPTAVIDIN SYSTEM

K.V. Serebrennikova^{1*}, J.V. Samsonova¹, A.P. Osipov²

(¹*Division of Chemical Enzymology, Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University*; ²*National University of Science and Technology "MISIS"*; **e-mail: ksenijasereb@mail.ru*)

A new approach for improving the sensitivity of lateral flow immunoassay based on the use of a complex conjugate is proposed. The complex conjugate is an agglomerate of gold nanoparticles formed by binding biotinylated antibodies labeled with gold nanoparticles to streptavidin. The amplification of the analytical signal occurs due to the accumulation of agglomerates of gold nanoparticles in the test zone of the strip. The proposed test system is implemented for lateral flow immunoassay of model protein, procalcitonin, and allows one-step analysis without additional reagents or manipulations. The range of procalcitonin detection was from 0.5 to 100 ng/ml with a limit of detection at 0.25 ng/ml, which is 4 times better the sensitivity of the conventional lateral flow immunoassay using spherical gold nanoparticles as a label.

Key words: lateral flow immunoassay; gold nanoparticles; biotin; streptavidin; procalcitonin.

Сведения об авторах: *Серебренникова Ксения Вячеславовна* – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ (ksenijasereb@mail.ru); *Самсонова Жанна Васильевна* – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (jvsamsonova@gmail.com); *Осипов Александр Павлович* – ст. науч. сотр. кафедры ФНСиВТМ Национального исследовательского технологического университета «МИСиС», канд. хим. наук (aprosipov@mail.ru).